

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平3-72892

⑫ Int. Cl. 5

C 12 P 7/40  
// C 12 P 7/40  
C 12 R 1:645

識別記号

庁内整理番号

6742-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)3月28日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 ジホモーアーリノレン酸の製造法および脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤

⑮ 特 願 平2-131357

⑯ 出 願 平2(1990)5月23日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)5月24日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 平1-128916

⑪ 発明者 中島 寿昭 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

⑪ 発明者 島内 敏次 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

⑪ 出願人 出光石油化学株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

⑪ 代理人 弁理士 久保田 藤郎

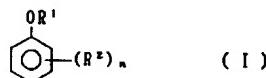
## 明細書

## 1. 発明の名称

ジホモーアーリノレン酸の製造法および脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) ジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式



(式中、R'は低級アルキル基を示し、R''は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R''が複数ある場合には、複数のR''は同一であっても異なっていてよい。nは0~5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモーアーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモーアーリノレン酸の製造法。

(2) 請求項1記載の式(I)で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明はジホモーアーリノレン酸(△8, 11, 14エイコサトリエン酸)を発酵法により安価に大量生産する方法および微生物や動物細胞の脂肪酸に対する△5位不飽和化反応抑制剤に関する。(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

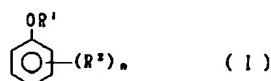
ジホモーアーリノレン酸を生産する方法として、グルコースを主原料とする培地にゴマ油を添加してモルティエレラ属微生物を培養することにより、ジホモーアーリノレン酸を含む脂質を生産する方法が知られている(H.Yamada, et al., J. Am Oil chem. Soc., Vol 66, p237~241(1989))。

また、脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤としては、ゴマ油中のセサミン、エビセサミンが知られている(H.Yamada, et al., 日本農芸化学会誌63巻, p676(1989))。しかしながら、セサミンやエビセサミンを大量に採ることはコスト的に高く、实用性に劣るという欠点があった。

## 〔課題を解決するための手段〕

そこで、本発明者らはジホモーアーリノレン酸の発酵法による大量生産について鋭意研究した結果、特定の化合物を培地に添加することにより目的を達成できること、並びに該化合物が脂肪酸の△5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式



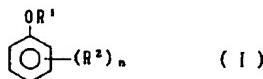
(式中、R'は低級アルキル基を示し、R<sup>o</sup>は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R<sup>o</sup>が複数ある場合には、複数のR<sup>o</sup>は同一であっても異なっていてもよい。nは0～5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモーアーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモーアーリノレン酸の製造法および上記一般式で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸の△

コキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。アルキル基としては例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基（直鎖状または枝状のいずれでもよい）などを、アルコキシ基としては例えばメトキシ基、エトキシ基などを、アルケニル基としては例えばアリル基、3-ブテニル基などを、オキシアルキル基としては例えばオキシメチル基、2-オキシエチル基、3-オキシプロピル基、4-オキシブチル基などを挙げることができる。また、R<sup>o</sup>が1分子内に複数ある場合には、複数のR<sup>o</sup>は同一であっても異なっていてもよい。nは0～5の整数を示す。上記一般式で表わされる化合物の具体例としては、アニソール、メキシフェノール、ジメトキシベンゼン、ジエキトシベンゼン、トリメトキシベンゼン、メトキシトルエン、tert-ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、オイゲノール等が挙げられる。これらは油脂などの抗酸化剤や香料として工業的に多く生産されているものが多いため、容易に手に入れることができる。

5位不飽和化反応抑制剤を提供するものである。

本発明で使用する微生物は、ジホモーアーリノレン酸生産能を有するものであればよく、例えばコニディオボラス属やモルティエレラ属に属するジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を挙げることができる。具体的には、コニディオボラス・ナノデス(*Conidiobolus nanodes*)CBS 183/62、コニディオボラス・ランプラウジェス(*Conidiobolus lamprae*)ATCC 12585、モルティエレラ・アルビナ(*Mortierella alpina*)IFO 8568等が挙げられる。

本発明では、上記微生物を培養してジホモーアーリノレン酸を製造するための培地に、一般式



(式中、R'、R<sup>o</sup>およびnは前記と同じである。)で表わされる化合物を含むことが必須である。上記一般式中のR'は低級アルキル基を示す。低級アルキル基としては炭素数1～6の低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基などが挙げられる。R<sup>o</sup>は水酸基、アルキル基、アル

上記一般式で表わされる化合物の添加量としては、培地1ℓあたり0.1～1.0g、好ましくは0.1～2gであるが、微生物の生育阻害が起きなければ多い程よい。添加方法は、エタノールやジクロロメタンなどの適当な溶媒に溶解して添加するともできるが、培地の炭素源として用いる油脂に混合して添加するのが好ましい。また、添加する時期は培養を始める前が好ましいが、培養途中から加えてもよい。

上記微生物を培養するための培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含むものが用いられる。炭素源としては、ブドウ糖、オリーブ油、サフラワー油、マーリノレン酸含有油などの炭水化物や油脂等が用いられる。ここでマーリノレン酸含有油としては、月見草油；モルティエレラ(*Mortierella*)属、ムコール(*Mucor*)属、カニンガメラ(*Cunninghamella*)属等に属する糸状菌から抽出された微生物油があげられる。また、窒素源としては酵母エキス、ペプトン、大豆粕などの有機窒素源が好ましく、無機塩類としてはリン酸カ

リウム ( $KH_2PO_4$ )、鉄塩 ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )、マグネシウム塩 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )、亜鉛塩 ( $ZnSO_4$ )などが用いられる。その他、必要に応じて微量元素や栄養源を添加することもできる。

上記微生物の培養は通常、液体培地にて振とう培養や通気攪拌培養などにより行なわれる。培養条件は培養温度  $10 \sim 40^\circ C$ 、好ましくは  $20 \sim 30^\circ C$ 、培養日数は  $1 \sim 20$  日であり、コニディオボラス属に属する微生物を用いる場合は  $3 \sim 7$  日が好ましいが、これらの条件は用いる微生物の性質等を考慮してジホモーアーリノレン酸の生産量が高くなるように設定すればよい。

このようにして培養物中にジホモーアーリノレン酸が生産されるので、培養物からジホモーアーリノレン酸を採取する。ジホモーアーリノレン酸は培養物よりそのまま採取してもよいが、培養物には炭素源として加えた油脂等が含まれるため、培養物より菌体を分離し、この菌体からジホモーアーリノレン酸を採取するのが好ましい。ジホモーアーリノレン酸の採取は、溶媒抽出やクロマト

$g / l$  加えた培地を作製した。この培地  $100 ml$  を  $500 ml$  の三角フラスコに入れ、 $121^\circ C$  で  $15$  分間滅菌処理した。このフラスコにコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、 $30^\circ C$  で  $4$  日間振とう培養した。

第1表 培地組成

|                      |        |
|----------------------|--------|
| $KH_2PO_4$           | 3 g    |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 g    |
| ペプトン                 | 10 g   |
| イーストエキストラクト          | 5 g    |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.01 g |
| 蒸留水                  | 1 l    |

培養終了後、遠心分離により菌体を集団し、リン酸緩衝液 ( $pH 7.0$ ) を用いて洗浄した後、吸引過により菌体を採取した。この菌体をアルミ製のカップに入れ、ガラスピース、メタノール、クロロホルムを加えてホモジナイザーで菌体を破碎し、菌体内の脂質を抽出した。抽出した脂質を  $B F_3$ -メタノールを用いてメチルエステル化し

グラフィーなどの常法により行なわれる。

次に、本発明の脂肪酸の  $\Delta 5$  位不飽和化反応抑制剤について説明する。本発明でいう  $\Delta 5$  位不飽和化反応とは、例えばジホモーアーリノレン酸からアラキドン酸への変換反応を指す。

本発明の脂肪酸の  $\Delta 5$  位不飽和化反応抑制剤は、前記一般式で表わされる化合物を主成分とするものである。その使用にあたっては、微生物や動物細胞に脂肪酸を加えたものに前記一般式で表わされる化合物を  $0.1 \sim 100 mg / g$  乾燥菌体、好ましくは  $5 \sim 70 mg / g$  乾燥菌体添加すればよく、これにより微生物や動物細胞の脂肪酸に対する  $\Delta 5$  位不飽和化反応を抑制することができる。

## 〔実施例〕

次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

## 比較例 1

第1表に示した組成の培地に炭素源として  $16\%$   $\tau$ -リノレン酸含有油（オレイン酸  $40\%$ 、リノール酸  $10\%$ 、 $\tau$ -リノレン酸  $16\%$ ）を  $30$

$g / l$  加えた培地を作製した。この培地  $100 ml$  を  $500 ml$  の三角フラスコに入れ、 $121^\circ C$  で  $15$  分間滅菌処理した。このフラスコにコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、 $30^\circ C$  で  $4$  日間振とう培養した。

て、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べた結果を第2表に示す。

なお、ジホモーアーリノレン酸の同定は以下の方法により行なった。ジホモーアーリノレン酸の標品と本サンプルを混合してキャビラリーガスクロマトグラフィー（カラム：PEG 20 M）で分析したところ、ジホモーアーリノレン酸画分のピークが大きくなかった。また、本サンプルを硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィーによりトリエン画分を分取した。この画分には $\tau$ -リノレン酸とジホモーアーリノレン酸が含まれていた。分取したトリエン画分から液体クロマトグラフィー（カラム：ODS）によりジホモーアーリノレン酸を分取した。このジホモーアーリノレン酸をピコリニル誘導化し、キャビラリーガスマススペクトラムにより同定した。その結果、 $\Delta 8, 11, 14$  エイコサトリエン酸、すなわちジホモーアーリノレン酸であることが確認された。

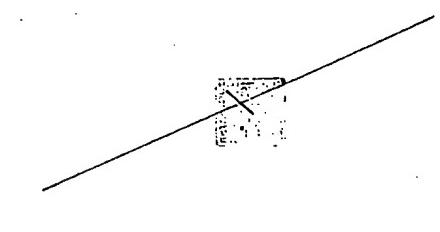
## 実施例 1

比較例 1 と同様の培地を作成し、これに第2表

第2表

|                                 | 比較例<br>1 | 実施例 1 |      |      |
|---------------------------------|----------|-------|------|------|
|                                 |          | 0.3   | 0.7  | 1.0  |
| BHA量(g/l)                       | 0        | 0.3   | 0.7  | 1.0  |
| 菌体収量(g/l)                       | 22.0     | 24.4  | 21.0 | 17.4 |
| 油脂収量(g/l)                       | 6.8      | 7.7   | 6.5  | 6.0  |
| 脂肪酸組成(%)                        |          |       |      |      |
| ミリスチン酸(C <sub>14:0</sub> )      | 1.1      | —     | 1.8  | —    |
| ハルミチン酸(C <sub>16:0</sub> )      | 24.1     | —     | 26.1 | —    |
| ステアリン酸(C <sub>18:0</sub> )      | 4.1      | —     | 4.6  | —    |
| オレイン酸(C <sub>18:1</sub> )       | 27.0     | —     | 30.0 | —    |
| リノール酸(C <sub>18:2</sub> )       | 6.1      | —     | 6.7  | —    |
| γ-リノレン酸(C <sub>18:3</sub> )     | 6.3      | —     | 6.3  | —    |
| エイコサモノイン酸(C <sub>20:1</sub> )   | 3.0      | —     | 1.9  | —    |
| ジホモ-γ-リノレン酸(C <sub>20:2</sub> ) | 4.1      | 8.6   | 13.3 | 11.5 |
| アラキドン酸(C <sub>20:4</sub> )      | 15.7     | 9.7   | 3.2  | 1.7  |
| ベヘン酸(C <sub>22:0</sub> )        | 3.2      | —     | 2.7  | —    |
| その他                             | 5.3      | —     | 3.4  | —    |
| ジホモ-γ-リノレン酸<br>収量(g/l)          | —        | 0.66  | 0.85 | 0.69 |

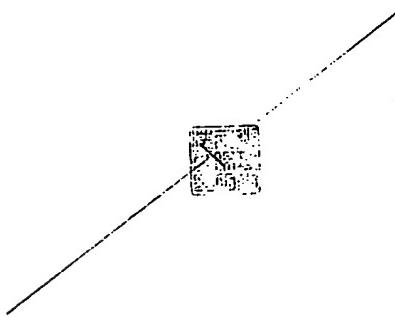
に示した所定量のtert-ブチルヒドロキシアニソール(BHA)を添加した。添加方法は、所定量のBHAをエタノールに溶解したものを500mlフラスコに入れ、さらに16%γ-リノレン酸含有油3gを加え、窒素気流下でエタノールをとばしてBHAを油に混合した後、ここに第1表に示した培地を100ml加えて培地を作成した。この培地を滅菌後、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第2表に示す。



第2表より明らかなように、BHAの添加によってジホモ-γ-リノレン酸の含有率が顕著に上昇し、アラキドン酸の含有率が相対的に低下しており、△5位不饱和化反応が特異的に阻害されていることがわかった。

#### 実施例2

実施例1において、第3表に示した所定量の化合物を用いたことおよび所定の培養日数にしたこと以外は実施例1と同様の操作を行なった。この結果を第3表に示す。



第3表

| 化合物(g/l)         | 培養日数<br>(日) | 菌体収量<br>(g/l) | ジホモーティリノレン酸<br>含有率(%) | アラキドン酸<br>含有率(%) | ジホモーティリノレン酸<br>収量(g/l) |
|------------------|-------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| アニソール            | 0.5         | 3             | 25.7                  | 7.9              | 0.65                   |
|                  | 1.0         | 5             | 19.9                  | 10.2             | 0.61                   |
| o-メトキシフェノール      | 0.5         | 4             | 20.4                  | 10.9             | 0.67                   |
|                  | 1.0         | 4             | 20.3                  | 9.5              | 0.62                   |
| オイゲノール           | 0.5         | 3             | 20.3                  | 10.4             | 0.68                   |
|                  | 1.0         | 4             | 22.3                  | 11.1             | 0.74                   |
| BHA              | 0.5         | 5             | 17.4                  | 11.5             | 0.69                   |
|                  | 1.0         | 4             | 27.9                  | 8.9              | 0.74                   |
| m-ジエトキシベンゼン      | 0.5         | 3             | 27.7                  | 11.3             | 1.11                   |
|                  | 1.0         | 3             | 28.7                  | 12.0             | 1.31                   |
| p-ジエトキシベンゼン      | 0.5         | 3             | 28.5                  | 9.1              | 0.85                   |
|                  | 1.0         | 3             | 25.3                  | 7.8              | 0.69                   |
| 1,2,3-トリメトキシベンゼン | 0.5         | 5             | 24.4                  | 6.9              | 0.67                   |
|                  | 1.0         | 7             | 21.3                  | 8.5              | 0.46                   |
| 1,2,4-トリメトキシベンゼン | 0.5         | 3             | 22.4                  | 7.8              | 0.59                   |
|                  | 1.0         | 4             | 13.8                  | 14.0             | 0.41                   |
| 1,3,5-トリメトキシベンゼン | 0.5         | 3             | 27.0                  | 7.2              | 0.64                   |
|                  | 1.0         | 3             | 22.3                  | 6.8              | 0.48                   |
| p-メトキシトルエン       | 0.5         | 4             | 34.8                  | 10.8             | 1.19                   |
|                  | 1.0         | 4             | 40.8                  | 10.0             | 1.10                   |

## 実施例 3

第1表に示した培地の3倍濃度の培地に16% テリノレン酸含有油を90 g/l 加え、さらにBHAを実施例1と同様の方法により2.1 g/l 加えた培地を作成した。この培地6 lを10 lジャーファメンターに入れ、121°Cで15分間滅菌した。次いで、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を第1表に示した培地に16%テリノレン酸含有油30 g/lを加えた培地600 mlで前培養したものを、上記ジャーファメンターに全量接種し、30°Cで7日間通気攪拌培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。その結果、アラキドン酸含有率は10%，ジホモーテリノレン酸含有率は15%，ジホモーテリノレン酸収量は培地1 lあたり3.3 gであった。

## 実施例 4

実施例2において、添加したBHA量を1 g/lとしたこと、培養日数を4日としたことおよび接種した微生物をコニディオボラス・ランブルラウジエス ATCC 12585としたこと以外は実施例2と同様の操作を行なった。その結果、菌体収量は18.7

g/l、油脂収量は5.8 g/l、ジホモーテリノレン酸含有率は9.3%，ジホモーテリノレン酸収量は0.54 g/l、アラキドン酸含有率は9.0%であった。

## 実施例5および比較例2

第1表に示した培地に16%テリノレン酸含有油30 g/l添加した培地（比較例2）、第1表に示した培地に16%テリノレン酸含有油30 g/lおよびBHA 0.5 g/l添加した培地（実施例5）を作成し、これらの培地にモルティエラ・アルビナ IPO 8568を接種し、20°Cで第4表に示した所定日数振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第4表に示す。

第4表

|      | 培養日数<br>(日) | 菌体収量<br>(g/l) | ジホモーテリノレン酸<br>含有率(%) | アラキドン酸<br>含有率(%) |
|------|-------------|---------------|----------------------|------------------|
| 実施例5 | 20          | 15.4          | 1.3                  | 0.8              |
| 比較例2 | 15          | 18.7          | 0.4                  | 1.1              |

表より明らかなように、モルティエレラ属微生物を用いた場合においてもアラキドン酸よりもジホモニアーリノレン酸含有率の高い油脂を得ることができた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、微生物菌体内のアラキドン酸含有率を下げ、ジホモニアーリノレン酸含有率を上げることができるので、ジホモニアーリノレン酸を効率よく安価に大量生産できる。また、本発明によれば脂肪酸の△5位不飽和化反応を低コストに抑制することができる。得られたジホモニアーリノレン酸は医薬、生化学用試薬として有用である。

特許出願人 出光石油化学株式会社

代理人 弁理士 久保田 邦 郎

